

# Evaluación de la diversidad genética y de parentesco en poblaciones de Rubia Gallega (*Bos Taurus*)

---

Avaliación da diversidade xenética e de parentesco en poboacións de Rubia Galega (*Bos Taurus*)

Evaluation of genetic diversity and kinship in populations of Rubia Gallega (*Bos Taurus*)

---

Máster en Biología molecular, celular y genética

**Paula Alvariño Martínez**



**Trabajo de Fin de Máster**

**Director:** Paulino Martínez Portela **Codirector:** Manuel Vera Rodríguez

**Septiembre 2019**

Universidad de A Coruña

## ÍNDICE

Abreviaturas y acrónimos.....	2
Resumen.....	3
Introducción.....	4
Objetivo.....	8
Material y métodos.....	9
Animales y muestreo.....	9
Evaluación de la diversidad genética.....	10
Análisis de diferenciación ( $F_{ST}$ ).....	11
Coeficiente de parentesco molecular.....	12
Resultados.....	14
Análisis de la diversidad genética.....	14
Análisis del índice de diferenciación $F_{ST}$ .....	15
Análisis del coeficiente de parentesco molecular.....	16
Discusión.....	20
Conclusiones.....	24
Agradecimientos.....	24
Bibliografía.....	25

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACRUGA: Asociación nacional de criadores de ganado vacuno selecto de raza Rubia Gallega

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EHW: Equilibrio Hardy-Weinberg

GWAS: *Genome-wide association study* (Estudios genómicos de asociación)

ICBF: Federación Irlandesa de Cría de Ganado

ISAG: *International Society of Animal Genetics* (Sociedad Internacional de Genética Animal)

MAF: *Minor allele frequency* (Frecuencia del alelo menos frecuente)

SNP: *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de un único nucleótido)

## RESUMEN

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación y con ellas el uso chips de SNPs para genotipado masivo, han demostrado ser útiles para evaluar la diversidad genética y el parentesco en poblaciones de diversas razas domésticas. En este estudio se utilizó el chip Axiom\_Bov MD\_v3 de Affymetrix para evaluar la diversidad genética y de parentesco en ejemplares de la raza vacuna Rubia Gallega. La heterocigosidad esperada fue de 0,3359, indicativo de que existe una gran diversidad dentro de la raza. El análisis del coeficiente de consanguinidad poblacional ( $F_{IS}$ ), el cual relaciona la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) respecto a la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) en la población, mostró un valor de -0,0015, que resultó no significativo, lo que sugiere que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg; dato concordante con el porcentaje de marcadores en equilibrio ( $P > 0,01$ ), que fue del 98,5%. El grado de diferenciación genética promedio, medido mediante el índice de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ), que indica si existe una deficiencia de heterocigosidad en una subpoblación en relación a la población total, varió de 0,0013 (agrupando los animales en base a su lugar de procedencia) a 0,0025 (formando agrupaciones en función del sexo). Los resultados obtenidos analizando un panel reducido de SNPs para los coeficientes de parentesco molecular, mostraron un bajo grado de parentesco entre los individuos estudiados. Indican, además, que si se analizan todos los SNPs disponibles, el parentesco estimado es menor. Por lo tanto, para dar un resultado de parentesco con un porcentaje de fiabilidad superior al 99%, es necesario analizar un número más elevado de SNPs.

## INTRODUCCIÓN

Las razas de ganado bovino europeas derivan de la migración de ganado del Cercano Oriente (Boyles & Pellegrino, 2009). Cuando esta expansión llegó a la Península Ibérica se realizaron nuevos cruces con animales del continente africano (Decker *et al.*, 2014). Los orígenes de los bovinos domésticos españoles, aún hoy en día no están del todo claros; según González *et al.* (1987) y Jordana *et al.* (1991) (revisado por Becerra, 2002) las razas bovinas españolas tienen un origen sifilitico, procediendo de las dos razas bovinas ancestrales *Bos taurus primigenius* y *B. taurus brachyceros*. Después, una vez establecidas las razas actuales, y dependiendo de la región, sus características y los límites geográficos, estas comenzaron a divergir en cada región hasta dar lugar a las razas actuales (Koolmees & Lenstra, 2014). Más recientemente, la aplicación sistemática de técnicas modernas de reproducción condujo a la diferenciación de las razas por aislamiento, deriva, selección y adaptación a su hábitat particular, y se estableció cada biotipo racial (Rof Codina, 1916).

La historia de la raza Rubia Gallega comienza cuando una rama humana celta procedente de Francia ocupó Galicia (en torno al siglo VI a.c.) con su ganado, e influyó sobre los bovinos autóctonos existentes en la zona (Oliete *et al.*, 2006; Boyles & Pellegrino, 2009). Durante las primeras etapas históricas se generalizó el uso de los bovinos como animales de trabajo, situación que continuó durante muchos siglos. Posteriormente, se utilizaron como animales de triple propósito centrado en la mejora en el calado, la producción de leche y la calidad de la carne, lo que creó la necesidad de mejorar la vaca rústica y seleccionar sementales (ACRUGA, 2011). En el caso concreto de Rubia Gallega, la solución adoptada fue la de introducir otras razas para "mejorar" la Rubia Gallega. Así, durante los siglos XIX y principios del XX, se sucedieron las importaciones de sementales de las razas Durhan, Angus, Hereford, Schwytz, Simmental, etc., (Becerra, 2002) con lo cual se produjo la pérdida de la unidad racial, conduciendo a esta raza a su estado actual (ACRUGA, 2011). En la actualidad, la Rubia Gallega está definida como una raza de producción de carne de calidad con buenas cualidades maternas (Sánchez Belda, 2002). Son animales de madurez tardía con una elevada tasa de crecimiento y un bajo desarrollo del tejido adiposo (Brea *et al.*, 1998), gran rusticidad y capacidad de adaptación a medios adversos (Oliete *et al.*, 2006). Su color es fundamentalmente rubio, trigueño o canela, su conformación es generalmente

larga y profunda, propia de los animales especializados en la producción cárnica (ACRUGA, 2019).

El censo actual de esta raza se sitúa alrededor de 40.000 cabezas, de las cuales más del 60% corresponde a reproductores (ACRUGA, 2011). La raza abarca toda la Comunidad Autónoma Gallega, si bien su foco central se encuentra en la zona montañosa de los Ancares en la provincia de Lugo, comprendida entre los 300 y 600 metros de altitud, en la que se encuentra el 75 % del censo (Ministerio de Agricultura, 2019). Además, se localizan puntualmente explotaciones de la raza Rubia Gallega en otras Comunidades Autónomas como Castilla y León, Madrid, La Rioja o Aragón (ACRUGA, 2019).

Como raza paternal, se utiliza en el cruce industrial tanto con razas de aptitud lechera como pueden ser Frisona o Jersey, así como con otras razas autóctonas de producción cárnica (Avileña, Limousine, Retinta, etc) (Oliete *et al.*, 2006), aportando en estos cruzamientos unas características productivas de gran valor económico. Proporciona terneros con muy buena ganancia media diaria de peso, y con elevados rendimientos a la canal (Sánchez Belda, 2002; Brea *et al.*, 1998). La genética de Rubia Gallega en el mundo está en plena expansión, tanto en países de nueva incorporación a la Unión Europea, como Polonia, Lituania, etc., como en países iberoamericanos como Brasil, Chile, Venezuela, etc., donde se utiliza para el cruce con cebú y razas criollas principalmente (Brahman, Nelore, Guzarat, Gyr, etc) (Becerra, 2002; ACRUGA, 2019).

La genética molecular ha repercutido sobre el avance de la producción y la salud animal y conjuntamente con los nuevos procedimientos estadísticos y bioinformáticos ha permitido identificar y utilizar la variación genómica para lograr la mejora genética del ganado, así como la realización de análisis de paternidad y parentesco (Aranguren-Méndez *et al.*, 2017). Los marcadores microsatélite han sido durante mucho tiempo el método más utilizado para la asignación de paternidad y parentesco en diferentes razas de ganado doméstico (Flanagan & Jones, 2019), debido a su naturaleza hipervariable. Sin embargo, la secuenciación de nueva generación ha ganado impulso rápidamente para el análisis de parentesco (Fisher *et al.*, 2009), debido a que algunos microsatélites en algunas especies mostraban bajo polimorfismo. La inversión inicial necesaria en términos de identificación de los loci, diseño de cebadores específicos de locus y optimización de las condiciones de PCR (Flanagan & Jones, 2019), además de las diferencias entre resultados obtenidos por diferentes laboratorios debido a las

inconsistencias o errores en la determinación del tamaño de los alelos del microsatélite (Fernández *et al.*, 2013) están contribuyendo a este progresivo cambio.

Los avances en la secuenciación de alto rendimiento del ADN, los software informáticos y la bioinformática han hecho que el uso de polimorfismos de nucleótido único (*Single Nucleotide Polimorphisms*, SNPs) se haya extendido rápidamente (Heaton *et al.*, 2002). Aunque en términos de información genética, un marcador bialélico puede considerarse como un paso atrás, los SNPs tienen algunas ventajas, incluida una mayor abundancia (Heaton *et al.*, 2005), estabilidad genética (Markovtsova *et al.*, 2000), nomenclatura más simple e idoneidad para el análisis automatizado y la interpretación de datos (Wang *et al.*, 1998). A pesar de su menor potencia por locus, su mucho menor coste, permite el genotipado de cientos o miles de marcadores que de forma combinada proporcionan una capacidad de asignación de parentesco superior a los paneles de menos de 20 microsatélites utilizados habitualmente (The Bovine HapMap Consortium, 2009; Fernández *et al.*, 2013). El uso de las plataformas de secuenciación masiva consigue secuenciar en paralelo millones de fragmentos de ADN en múltiples individuos, lo cual redundan en un abaratamiento de costes y del tiempo de realización de los experimentos (Schloss, 2008). Además, la secuenciación masiva presenta otras ventajas (van Dijk *et al.*, 2014). En primer lugar, no es necesario clonar el ADN en bacterias, dado que las plataformas de secuenciación trabajan con bibliotecas genómicas preparadas en sistemas libres de células. En segundo lugar, se elimina la electroforesis para detectar las bases secuenciadas, con la implementación de otras metodologías que permiten acelerar el proceso de obtención de secuencias. Además, mediante la secuenciación masiva, se puede determinar un amplio espectro de polimorfismos genómicos, desde la variación de un único par de bases o mutaciones puntuales (SNPs) hasta inserciones y deleciones, o duplicaciones genómicas (López de Heredia, 2016). Una de las mayores limitaciones es el manejo del elevado volumen de datos generado en cada experimento (Zhao *et al.*, 2013), que requiere una cierta destreza en la utilización de técnicas informáticas avanzadas y de una adecuada infraestructura computacional.

Los SNPs cubren homogéneamente todo el genoma a densidades muy altas, por lo que se han utilizado los paneles de SNPs para caracterizar razas bovinas en España y Europa (Dunner *et al.*, 2013). Son marcadores codominantes que resultan especialmente eficientes para distinguir las tres posibles combinaciones genotípicas (homocigotos para

cada una de las dos variantes y su heterocigoto). Esto es consecuencia de que los SNPs son bialélicos, por eso se obtienen las tres combinaciones,  $(n \cdot (n+1) / 2)$ , donde  $n$  es el número de elementos que se tienen y combinan consigo mismo y entre ellos. Sin embargo, al ser bialélicos, los SNPs proporcionan una información más limitada, puesto que sólo pueden diferenciar entre dos grupos de sujetos: los que presentan la variante de referencia y los que no. Pero, al mismo tiempo, el hecho de que sean bialélicos, facilita el genotipado de alto rendimiento y minimiza las sustituciones recurrentes en un solo sitio porque es muy poco probable que se produzca una misma mutación en el mismo sitio (Gautier *et al.*, 2007; Decker *et al.*, 2014). Fundamentalmente desde el proyecto genoma bovino (2009) (The Bovine HapMap Consortium, 2009) se han detectado multitud de variantes alélicas de SNPs asociados con determinadas razas (Wiedmann *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009). El genoma bovino está compuesto por 29 cromosomas y tiene un tamaño físico de 2,87 Gb (Liu *et al.*, 2009). Contiene en torno a 22.000 genes, 14.000 de los cuales son comunes a todos los mamíferos y más del 80% están presentes también en la especie humana (The Bovine HapMap Consortium, 2009; Ortega, 2011).

Los marcadores de ADN son cada vez más importantes en la cría de animales y se han utilizado con éxito en la identificación bovina, en pruebas de paternidad y para establecer relaciones entre dos o más individuos (Fernández *et al.*, 2013). Por ello, desde 2012, la norma internacional para la verificación de SNPs en *Bos taurus* han sido los paneles de SNP de la Sociedad Internacional de Genética Animal (*International Society of Animal Genetics*, ISAG) (McClure *et al.*, 2018). El panel de SNPs para paternidad recomendado por la ISAG de 100 SNP (ISAG100) tiene una probabilidad de exclusión parental (PE)  $> 0,999$  y el panel ISAG200 (200 SNP) tiene un PE  $> 0,99999999$  (<http://www.isag.us/>). Si bien estos paneles proporcionan un mayor nivel de precisión de parentesco con respecto a los marcadores microsatélite (Strucken *et al.*, 2014; McClure1 *et al.*, 2015), pueden validar un falso padre con una tasa  $\leq 1\%$ , lo que indica que se necesitan más SNPs si se requiere un resultado más preciso (Vandeputte & Haffray, 2014; McClure *et al.*, 2018).

La disponibilidad de SNPs ha sido particularmente útil para evaluar la diversidad genética y estimar relaciones filogenéticas (Decker *et al.*, 2014), debido a que permiten realizar estudios genéticos y de poblaciones a gran escala (Deepti *et al.*, 2012). Representan uno de los enfoques más interesantes para el genotipado porque son



abundantes en el genoma, genéticamente estables y susceptibles de análisis automatizados de alto rendimiento (Vignal *et al.*, 2002). A pesar de una gran cantidad de SNPs identificados en el proyecto de secuenciación del genoma bovino, no todos ellos han sido validados y dependiendo de la raza a estudiar, existen un mayor o menor abanico de SNPs validados (Edea *et al.*, 2013).

## OBJETIVO

En el presente estudio se pretende evaluar la diversidad genética, el grado de diferenciación y la relación de parentesco en la raza Rubia Gallega mediante la utilización de un panel de 78 SNPs perteneciente a la ISAG. Asimismo, se pretende valorar la precisión de los distintos paneles de SNPs para el análisis de parentesco con el objetivo de minimizar costes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales y tamaño de muestra

Un total de 222 animales de raza Rubia Gallega fueron analizados como población de referencia para evaluar su diversidad genética y de parentesco, de los cuales 168 son machos, 52 hembras y dos inciertos. Los animales estudiados proceden principalmente de la provincia de Lugo, aunque hay ejemplares del resto de provincias gallegas e incluso de fuera de Galicia. El ADN de las muestras analizadas procedió de semen, pelo o sangre entera (tomada de la vena caudal en tubos con EDTA como anticoagulante y medio conservante de ADN). Las muestras se agruparon para el análisis, según su localidad de procedencia, tal y como se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Agrupación de los individuos analizados por provincias

PROVINCIA	Nº de individuos
Lugo	201
A Coruña	11
Ourense	3
Pontevedra	3
Fuera de Galicia	4

Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo descrito en el kit de extracción de ADN MagMAX<sup>TM</sup> CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems), utilizando el procesador de partículas MagMAX Express-96. El genotipado de los SNPs se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando el chip Axiom Bov MD\_v3 (Affymetrix) diseñado para 57.053 SNPs, en el laboratorio comercial de la empresa Xenética Fontao (Lugo, España).

Los datos para el análisis fueron facilitados por la Asociación nacional de criadores de ganado vacuno selecto de raza Rubia Gallega (ACRUGA) que contrató el servicio a Xenética Fontao.

## **Evaluación de la diversidad genética**

Antes de comenzar con el análisis fue necesario hacer una selección de calidad de SNPs para que los resultados fueran lo más consistentes posible. De los 57.053 SNPs iniciales se eliminaron 15 marcadores debido a errores en el genotipado, lo que determinó que se retuvieran un total de 57.038 SNPs. Además, para la evaluación de la diversidad genética de los 222 animales, se aplicaron una serie de filtros de calidad a nivel poblacional para la selección final de los animales y marcadores a utilizar:

- Porcentaje de genotipado en más del 95% de las muestras
- Frecuencia alélica menor (MAF)  $> 0,01$
- Marcadores en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,01$ )

Para todos estos filtrados genéticos se utilizó el software de libre acceso PLINK versión 1.09 (Chang, 2019) que está constituido por un conjunto de herramientas para el estudio de genomas completos.

Se establecieron unos valores umbrales para cada criterio y se seleccionaron sólo los SNPs que satisficieran todos los valores del umbral.

En primer lugar, se identificaron los individuos cuyo genotipado fue legible en al menos un 2% de los SNP. Para ello, se utilizó el comando “--mind 0,02”. Este valor de 0,02, que viene por defecto en el programa PLINK, está fijado de tal manera que sólo se eliminen los individuos con errores graves de genotipado relacionados con la calidad del ADN, permitiendo que sean realmente los filtros aplicados a los SNPs los que reduzcan el número de individuos.

Fijando un nivel de MAF de 0,01, se garantiza que se conserve cualquier SNP que pueda tener una forma alélica rara. Utilizamos el comando “--maf 0,01” que hará que se conserven los SNP cuyo alelo menos común esté presente en al menos el 1% de la población.

También se eliminaron los SNPs cuya lectura no fue posible en un número mínimo de individuos de la población. Para ello se utilizó el comando “--geno 0,05”, el cual elimina los SNPs genotipados en menos de un 5% de las muestras disponibles.

Para determinar el porcentaje de loci que se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg ( $P > 0,01$ ) en la población estudiada, se utilizó el software de libre acceso PLINK versión 1.09 (Chang, 2019). La Ley de Hardy-Weinberg establece que, en una población grande bajo apareamiento aleatorio, sin selección, mutación o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen en un valor de equilibrio y permanecen constantes a lo largo de las generaciones. La comprobación de este equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se realizó mediante comparación de los datos genotípicos observados y los esperados en el equilibrio dentro de la muestra.

Se considera que un locus es polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia inferior a 0,95 ( $P_{95}$ ) o a 0,99 ( $P_{99}$ ). Por otro lado, el estimador más completo de la diversidad genética es la heterocigosidad de la población, medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus. Existen dos tipos de heterocigosidad, la heterocigosidad observada, entendida como la proporción de individuos heterocigotos observados en una muestra de la población, y la heterocigosidad esperada o diversidad genética calculada a partir de las frecuencias alélicas de la muestra (Nei, 1978). De igual forma, para determinar la heterocigosidad de la población estudiada, se utiliza el software de libre acceso PLINK versión 1.09 (Chang, 2019).

Asimismo, se estimó el coeficiente de consanguinidad poblacional ( $F_{IS}$ ) que relaciona la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) respecto a la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) en cada subpoblación de la siguiente manera:  $F_{IS} = (H_e - H_o) / H_e$ . Este parámetro fue estimado utilizando el software Genepop 4.2 (Rousset, 2008).

### **Análisis de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ )**

El coeficiente de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) es un estadístico que indica la existencia de una deficiencia de heterocigotos en la población total con respecto a las subpoblaciones estudiadas. Para evaluar la divergencia entre las diferentes localidades estudiadas, se calculó el valor de  $F_{ST}$  a partir de las frecuencias alélicas de las distintas localidades así como la divergencia entre machos y hembras, para lo que se ha subdividido la población en base a su sexo y se ha calculado su coeficiente de diferenciación poblacional.

Para realizar estos análisis se ha utilizado el software Genepop 4.2 (Rousset, 2008) y se ha dividido la población total en subpoblaciones en relación a la provincia de la que provienen los animales estudiados, como se indica en la Tabla 1. Se repitió este mismo análisis para evaluar si existe diferenciación genética entre machos y hembras, por lo que, en este caso, la población total se dividió en dos subpoblaciones diferenciando los ejemplares por sexo.

### **Coefficiente de parentesco molecular**

Antes de continuar con el análisis, se realizó un segundo filtrado del conjunto total de datos. Como el número de SNPs analizados es muy elevado, se llevó a cabo una selección de aquellos marcadores que estuvieran presentes en el panel mínimo o CORE de la ISAG. Este panel consta de 100 SNP, de los cuales 78 han sido analizados en este estudio con un resultado óptimo. Este proceso de selección se realizó con el software de acceso libre PLINK versión 1.09 (Chang, 2019). El archivo de partida para realizar la selección o criba de SNPs fue el obtenido después de la realización de todos los filtrados y los procesos de control de calidad.

El software PLINK no es capaz de realizar cálculos para el coeficiente de parentesco por lo que se utilizó un software en línea de libre acceso denominado PDGSpider versión 2.1.1.5 (Lischer & Excoffier, 2012) para convertir los archivos de salida de PLINK (archivos con extensión .map y .ped) en un archivo con extensión .genepop, el cual fue, a su vez, el archivo de entrada para el software SPAGeDi versión 1.5 (Hardy OJ, 2002). SPAGeDi es un paquete informático diseñado principalmente para caracterizar la estructura genética espacial de familias y poblaciones mapeadas utilizando datos de genotipo de cualquier nivel de ploidía. Este software calcula el coeficiente de parentesco molecular entre individuos, es decir, calcula la probabilidad de identidad por descendencia entre pares de individuos o grupos. Puede calcular varios estadísticos que describen la relación o diferenciación entre individuos o poblaciones mediante comparaciones por pares, y analizar cómo estos valores están relacionados con distancias geográficas.

Para la obtención del coeficiente de parentesco mediante el software SPAGeDi (Hardy OJ, 2002) se seleccionaron una serie de parámetros, entre los que destacan la utilización

del estadístico  $r$  de Wang (2002) y el método computacional de Jackknife. Los resultados se visualizaron en una matriz para facilitar la comparación entre los distintos pares.

Este mismo análisis se realizó analizando por un lado todos los SNPs, y por otro, los 78 marcadores del panel CORE, para hacer una comparativa y determinar si los 78 SNPs procedentes del panel CORE de la ISAG son suficientes para dar un resultado equivalente al obtenido con el conjunto total de marcadores.

## RESULTADOS

### Análisis de la diversidad genética

La diversidad genética de todos los individuos se evaluó mediante diferentes estimadores previo filtrado de los 57.033 SNPs. En primer lugar, se eliminaron SNPs con tasas de error mendelianas superiores al 5% y SNPs con errores de genotipado. Se eliminaron 485 loci, por lo tanto, la proporción de marcadores genotipados en el 95% de las muestras fue del 99,4% (Tabla 2), lo que sugiere que el chip utilizado para el análisis, es muy fiable. La proporción de SNPs con un MAF > 0,05 fue de un 72,1% (Tabla 2). Esto indica que gran parte de los SNPs segregan en un porcentaje mínimo de los animales estudiados. Adicionalmente, se han eliminado muestras de 6 individuos debido a que fueron genotipados para menos del 2% de SNPs del panel. Finalmente, 40.836 SNPs y 216 muestras pasaron los filtros y los controles de calidad necesarios para continuar el análisis.

El coeficiente de consanguinidad poblacional o  $F_{IS}$  relaciona la heterocigosidad observada con la heterocigosidad esperada en EHW ( $F_{IS} = (H_e - H_o) / H_e$ ). Si  $H_o > H_e$ , el valor de  $F_{IS}$  es negativo y denota un exceso de heterocigotos, en caso contrario, es positivo, e indica un defecto de heterocigotos en la muestra.

**Tabla 2.** Caracterización de SNPs en función de su diversidad y EHW

	<b>Marcadores genotipados en &gt; 95% de las muestras</b>	<b>Marcadores con MAF<sup>1</sup> &gt; 0,01</b>	<b>Marcadores en EHW<sup>2</sup> (P &gt; 0,01)</b>	<b>(H<sub>o</sub>)<sup>3</sup></b>	<b>(H<sub>e</sub>)<sup>4</sup></b>	<b>F<sub>IS</sub><sup>5</sup></b>
<b>Muestras</b>	99,4%	72,1 %	98,5%	0,3364	0,3359	-0,0015

<sup>1</sup>MAF = Alelo menos frecuente // <sup>2</sup>EHW = Equilibrio Hardy-Weinberg // <sup>3</sup>H<sub>o</sub> = Heterocigosidad observada // <sup>4</sup>H<sub>e</sub> = Heterocigosidad esperada // <sup>5</sup>F<sub>IS</sub> = Coeficiente de consanguinidad poblacional

No se observaron desviaciones sistemáticas del equilibrio Hardy-Weinberg entre los marcadores polimórficos, ya que el porcentaje de marcadores en equilibrio Hardy-Weinberg (P > 0,01) fue del 98,5%. Los resultados de las desviaciones de la heterocigosidad observada respecto de la esperada muestran un leve exceso de

heterocigotos (-0,0015) aunque no significativo ( $P > 0,05$ ), que corrobora que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

### Análisis del índice de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ )

El análisis generó un valor global promedio de diferenciación en el territorio de 0,0013, que indica que solo el 0,13% de la variabilidad genética existente se debe a diferencias genéticas entre provincias y el resto a diferencias intrapoblacionales.

Los valores de  $F_{ST}$  resultantes entre las muestras de las distintas localidades se observan en forma de matriz en la Tabla 3. Los datos negativos se pueden considerar como “0”, es decir, no hay diferenciación entre las poblaciones. Los animales de fuera de Galicia no presentaron diferenciación con los animales de ninguna de las localidades gallegas. De igual modo, entre la muestra de las localidades de Lugo y A Coruña tampoco existe diferenciación. Las muestras que presentan un grado de diferenciación más elevado son las pertenecientes a Pontevedra y A Coruña (0,0033), lo que indica que solamente el 0,33% de la variabilidad genética existente se debe a diferencias genéticas entre provincias. Se debe tener en cuenta, para este análisis, que las muestras no presentaron tamaños poblacionales similares, lo que puede influir en los resultados. Todos los valores de  $F_{ST}$  estimados resultaron no significativos ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 3.** Matriz apareada de datos  $F_{ST}$  entre las muestras de las distintas localidades.

	<i>Lugo</i>	<i>A Coruña</i>	<i>Pontevedra</i>	<i>Ourense</i>
<i>A Coruña</i>	-0,0009			
<i>Pontevedra</i>	0,0003	0,0033		
<i>Ourense</i>	0,0006	0,0023	0,0008	
<i>Fuera</i>	-0,0051	-0,0090	-0,0023	-0,0003

Cuando se analizó la población total dividida en machos y hembras, se obtuvo un valor  $F_{ST}$  de 0,0025 que indicó que el 0,25% de la variabilidad genética entre los individuos de las diferentes poblaciones se debe a diferencias genéticas entre machos y hembras.



Los resultados de estos análisis de diferenciación poblacional fueron concordantes entre sí y sugirieron que todos los animales analizados provienen de una población ancestral común y muy reciente ya que todavía no pasó el tiempo suficiente como para que se haya producido una diferenciación genética significativa.

#### **Análisis del coeficiente de parentesco molecular**

Los resultados obtenidos para los análisis de parentesco molecular se muestran en las Tablas 4 y 5. Se observó que los coeficientes de parentesco son menores si se analizan todos los SNPs y que hubo una mayor relación de parentesco entre hembras que entre machos o entre machos y hembras (Tablas 4 y 5).

**Tabla 4.** Coeficientes de parentesco medios calculados para los SNP del CORE compuesto por 78 SNPs.

	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>
<i>Machos</i>	0,010	
<i>Hembras</i>	0,013	0,032

**Tabla 5.** Coeficientes de parentesco medios calculados para todos los SNPs.

	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>
<i>Machos</i>	-0,006	
<i>Hembras</i>	0,003	0,024

El software SPAGeDi también proporcionó una tabla con las relaciones de parentesco por pares entre todos los ejemplares. Estas relaciones también se compararon analizando los dos conjuntos de datos utilizados de los que se dispuso (i.e. exclusivamente los 78 SNPs del CORE y todos los SNPs). Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 6 y 7.

Se observa que, realizando el análisis con todos los SNPs, el porcentaje de individuos emparentados disminuye considerablemente con respecto a los resultados obtenidos exclusivamente realizando el análisis con 78 SNPs (94,20% frente a 74,67% en el caso de los machos y 90,35% frente a 70,97% en el caso de las hembras). Esto podría llevar a obtener un resultado erróneo si sólo se realiza un análisis con 78 SNPs, ya que este análisis proporciona un mayor porcentaje de individuos emparentados de lo que proporciona el análisis con el panel completo de SNPs y de lo que presumiblemente podría estar ocurriendo en la realidad.

**Tabla 6.** Relaciones de parentesco basadas en el análisis de solo 78SNP.

		<i>UR</i> $\leq 0,125$	<i>HS</i> $0,125-0,375$	<i>FS</i> $\geq 0,375$	<i>TOTAL</i>
<i>Machos</i>	Nº DE RELACIONES DE PARENTESCO	9738	3039	264	13041
	% DE RELACIONES DE PARENTESCO	74,67	23,30	2,02	100
<i>Hembras</i>	Nº DE RELACIONES DE PARENTESCO	941	375	10	1326
	% DE RELACIONES DE PARENTESCO	70,97	28,28	0,75	100

UR  $\leq 0,125$  =individuos no emparentados; HS  $0,125-0,375$ = medios hermanos; FS  $\geq 0,375$  = hermanos completos.

**Tabla 7.** Relaciones de parentesco basadas en el análisis de todos los SNP disponibles

		<i>UR</i>	<i>HS</i>	<i>FS</i>	<i>TOTAL</i>
		$\leq 0,125$	$0,125-0,375$	$\geq 0,375$	
<i>Macho</i>	Nº DE RELACIONES DE PARENTESCO	12285	622	134	13041
	% DE RELACIONES DE PARENTESCO	94,20	4,77	1,03	100
<i>Hembra</i>	Nº DE RELACIONES DE PARENTESCO	1198	128	0	1326
	% DE RELACIONES DE PARENTESCO	90,35	9,65	0,00	100

UR  $\leq 0,125$  = individuos no emparentados; HS  $0,125-0,375$  = medios hermanos; FS  $\geq 0,375$  = hermanos completos.

Debido a que la gran mayoría de los animales proceden de la provincia de Lugo, se analizó si existía un mayor coeficiente de parentesco entre estos ejemplares en relación a los ejemplares procedentes de otros lugares. Como ocurre con el análisis anterior, al analizar las muestras teniendo en cuenta todos los SNPs, los coeficientes de parentesco disminuyeron drásticamente llegando a ser incluso negativos en este caso (Tabla 8). Los porcentajes de parentesco siguen el mismo patrón, existiendo un porcentaje más elevado de individuos no emparentados al analizar todos los SNP disponibles (Tabla 9).

**Tabla 8.** Coeficientes de parentesco medios para los ejemplares procedentes de la provincia de Lugo (LUGO) y los de otros orígenes (FUERA).

		<i>Panel CORE</i>		<i>Todos SNP</i>	
		LUGO	FUERA	LUGO	FUERA
LUGO		0,014		-0,001	
FUERA		0,010	-0,002	-0,004	-0,015

**Tabla 9.** Relaciones de parentesco dependientes del lugar de procedencia de las muestras.

			<i>UR</i>	<i>HS</i>	<i>FS</i>	<i>TOTAL</i>
			$\leq 0,125$	$0,125-0,375$	$\geq 0,375$	
<i>Panel CORE</i>	LUGO	Nº DE RELACIONES DE PARENTESCO	14025	4562	328	18915
		% DE RELACIONES DE PARENTESCO	74,15	24,12	1,73	100
	FUERA	Nº DE RELACIONES DE PARENTESCO	161	45	4	210
		% DE RELACIONES DE PARENTESCO	76,67	21,43	1,90	100
<i>Todos SNP</i>	LUGO	Nº DE RELACIONES DE PARENTESCO	17754	1008	153	18915
		% DE RELACIONES DE PARENTESCO	93,86	5,33	0,81	100
	FUERA	Nº DE RELACIONES DE PARENTESCO	202	5	3	210
		% DE RELACIONES DE PARENTESCO	96,19	2,38	1,43	100

UR  $\leq 0,125$  = individuos no emparentados; HS  $0,125-0,375$  = medios hermanos; FS  $\geq 0,375$  = hermanos completos.

Todos estos resultados indicaron que analizar únicamente los SNP del panel CORE de la ISAG no fue lo suficientemente informativo en cuanto a relaciones de parentesco se refiere, ya que tanto los coeficientes de parentesco, como el porcentaje de relaciones de parentesco no fueron lo suficiente representativos, cuando se analiza solamente el panel con 78 SNPs.

## DISCUSIÓN

El primer sistema de genotipado de alta densidad en una especie domestica fue el chip de 10K (10.000 SNPs) comercializado por Affymetrix® para ganado vacuno (The Bovine HapMap Consortium, 2009). Sin embargo, este número de SNPs resultaba insuficiente, por ejemplo, para estudios genómicos de asociación (GWAS), poniendo de manifiesto la necesidad de un chip con mayor densidad de marcadores para la especie. El chip de Illumina® Bovine SNP50 (Matukumalli *et al.*, 2009) con cerca de 50.000 SNPs fue desarrollado por un consorcio de laboratorios mediante la utilización de secuenciación masiva para la caracterización de nuevos SNPs en diversas razas bovinas. La utilización de chips de alta densidad permite obtener resultados de marcadores que pueden estar en baja frecuencia en la población estudiada, permitiendo su utilización en distintas razas en las que las frecuencias génicas de los marcadores pueden diferir significativamente. Otra ventaja de los chips de alta densidad consiste en la posibilidad de establecer con una razonable precisión los haplotipos existentes en las muestras genotipadas. Así en el caso de la especie bovina, el chip de genotipado de alta densidad Illumina® BovineHD (con más de 700.000 SNP) junto con el chip de baja densidad Illumina® Bovine 3K (con unos 3.000 SNP) (Illumina, 2015), permiten inferir haplotipos con una precisión aceptable y a un coste muy razonable (Genoma España, 2011). El chip utilizado en este estudio, Axiom Bov MD\_v3 de Affymetrix® diseñado para unos 60.000 SNPs permite la obtención de resultados similares a los obtenidos con el chip de Illumina® Bovine SNP50, con un software más sencillo que el desarrollado por Illumina®, pero con menos años de experiencia y por lo tanto, mayor grado de manipulación de las muestras durante su procesado, menor robustez del equipo y un número inferior de SNPs validados.

La proporción de SNPs polimórficos calculado en base a un MAF > 0,01 en el análisis realizado fue de un 72,1%. Este resultado es similar al obtenido en varias razas de ganado bovino europeas (73-83%) utilizando 696 SNPs (Gautier *et al.*, 2007), pero ligeramente superior al obtenido en razas de bovino africanas (47-71%) también con este mismo panel de marcadores (Gautier *et al.*, 2007). Esto puede deberse a que la raza Rubia Gallega es una raza europea con importante similitud genética con otras razas de carne, de ahí los resultados similares. Por otro lado, el chip utilizado probablemente esté optimizado para razas europeas, por lo que en razas africanas se detecta un menor grado

de polimorfismo. Puede deberse, además, a que las razas africanas presentan un menor número de marcadores polimórficos que las razas bovinas europeas. En otro estudio donde se analizó la diversidad de varias razas de ganado bovino españolas utilizando el chip de Illumina® BovineHD BeadChip diseñado para 777.962 SNPs (Cañas-Álvarez *et al.*, 2015), el grado de polimorfismo observado varió entre un 86-89%. Este chip es el más completo y el que abarca de manera más uniforme todo el genoma bovino (Illumina, 2015). Concretamente para Rubia Gallega, el grado de polimorfismo fue del 87,8%, superior al obtenido en el presente estudio. Las diferencias entre las estimaciones pueden deberse a que en este estudio el tamaño muestral es menor o a los SNPs analizados.

La matriz apareada de datos  $F_{ST}$  entre las muestras procedentes de las distintas localidades dio como resultados que las muestras más diferenciadas son las pertenecientes a ejemplares procedentes de Pontevedra y A Coruña, aunque la diferenciación detectada es muy baja. Estas son las poblaciones, junto con la de Lugo, con un mayor número de individuos, y, por lo tanto, donde la estimación es más fiable. Por otro lado, se ha obtenido un índice de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) promedio que varía entre 0,001 y 0,002 dependiendo de los subgrupos que se hayan utilizado para el análisis. Se observó que el mayor grado de diferenciación genética obtenido se debe a diferencias entre machos y hembras, más que al lugar de procedencia. Esto sugiere que la población de Rubia Gallega estudiada se diversificó recientemente, por lo que todavía no existen diferencias significativas entre las distintas poblaciones y gran parte de la diferenciación se debe a la propia biología de la especie, es decir, a diferencias genéticas entre los distintos ejemplares, incluyendo las diferencias entre machos y hembras. Se obtuvo un resultado de diferenciación muy bajo en relación a estudios de diversas razas vacunas españolas o europeas. Gautier *et al.* (2007) observaron valores promedio de  $F_{ST}$  de 0,099 en razas europeas, al contrario que Edea *et al.* (2013) quienes observaron un bajo nivel de diferenciación en poblaciones de ganado etíope ( $F_{ST} = 0,010$ ). Esto concuerda con los resultados anteriores, sugiriendo que las razas africanas presentan un nivel de polimorfismo y diferenciación genética inferiores.

Cañas-Álvarez (2015) analizó el grado de descomposición de la diversidad genética total en los componentes dentro y entre razas bovinas españolas, obteniendo un resultado de  $F_{IS} = 0,0140$  para rubia Gallega, lo que indica que existen bajos niveles de consanguinidad dentro de esta raza, y de  $F_{ST} = 0,0440$  entre las razas estudiadas, que a

su vez, sugiere la existencia de un fondo genético común para todas las razas. En el presente estudio se obtuvo un valor de  $F_{IS}$  de -0,0015, similar al obtenido por Cañas-Álvarez. Se trata de un valor muy bajo y no significativo que confirma que las frecuencias alélicas de la población están en las proporciones esperadas de Hardy – Weinberg. Por otro lado, el valor de  $F_{ST}$  en la población estudiada en este trabajo fue de 0,0013, y esto probablemente se deba a que se ha analizado la diversidad entre individuos de una misma raza. Zhao *et al.* (2015), por ejemplo, obtuvieron valores de  $F_{ST}$  de 0,0876 en un análisis de ganado vacuno lechero y de carne procedente de la Federación Irlandesa de Cría de Ganado. En un estudio de 18 razas bovinas locales europeas utilizando 16 microsatélites (Essa *et al.*, 2001) se obtuvo un valor  $F_{ST}$  de 0,0700. Las diferencias con nuestro estudio se deben a que se está comparando índices de diversidad entre diferentes razas, donde la diferenciación esperada es mayor.

No se observaron tampoco desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg entre los marcadores polimórficos, lo que indica que toda la población es una única unidad panmíctica y no se están produciendo apareamientos clasificados. Esto concuerda con el valor  $F_{IS}$  obtenido (-0,0015) y discutido anteriormente. Las heterocigosidades esperadas y observadas fueron similares, lo que indica ausencia de estratificación dentro de la raza (Cañas-Álvarez, 2015). En el estudio de Cañas-Álvarez (2015) se describió que la población de Rubia Gallega estudiada presentó una heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) de 0,3080, valor similar al que obtuvimos en este estudio ( $H_e = 0,3359$ ), que indica que existe una gran diversidad dentro de la raza. Ambos resultados fueron similares a los observados por Gautier *et al.* (2007) en razas bovinas europeas, donde se obtuvo una  $H_e$  de 0,3000. A su vez, también se observaron valores similares en *B. indicus* ( $H_e = 0,3500$ ) y en *B. taurus* ( $H_e = 0,4000$ ) en ganado indígena de Etiopía y Corea (Edea *et al.*, 2013).

Los análisis de parentesco realizados indicaron que la gran mayoría de los individuos analizados de esta población de Rubia Gallega no están emparentados entre sí. Considerando más representativas las relaciones de parentesco entre animales procedentes de la provincia de Lugo, donde también hay un mayor censo, se observa que entre el 6 y el 24% de los animales son medios hermanos y solo entre el 0,8 y el 1,7% son hermanos, de lo que se desprende que existe poca consanguinidad en la raza. También se observa como el porcentaje de relaciones entre individuos disminuye al analizar todos los SNPs disponibles. Esto sugiere que 78 SNPs del CORE no son

suficientes para la asignación de parentesco; como indica Flanagan & Jones (2019) donde se sugiere que son necesarios entre 100 y 500 SNP para realizar una estima precisa de parentesco en la mayoría de las situaciones. De no ser así, se cometerían errores y cabría la posibilidad de sobreestimar el parentesco entre los individuos analizados. De manera similar, la Federación Irlandesa de Cría de Ganado (ICBF) (Mcclure *et al.*, 2018) analizó diferentes densidades de SNPs para determinar que, como mínimo, se necesitan  $\geq 500$  SNP para predecir paternidades de forma consistente con una tasa de error menor o igual al 1%.

Por otro lado, Fisher *et al.* (2009) demostraron que un panel de 40 SNPs (donde la MAF media era de 0,350) es una herramienta de diagnóstico igual o mejor que el panel de 14 microsatélites utilizado para pruebas de paternidad en animales lecheros de Nueva Zelanda. Los marcadores bialélicos tienen limitaciones respecto a marcadores con un número más elevado de alelos como los microsatélites, ya que son más sencillos términos de información genética y potencia por locus, es decir, son menos informativos que los microsatélites (Heaton *et al.*, 2005). Aun así, ha aumentado mucho el uso de SNPs debido a su fácil genotipado y a que los datos se pueden comparar e incorporar entre diferentes laboratorios, aspecto que no puede realizarse con los loci microsatélites, que no son comparables entre laboratorios, a no ser que exista una calibración alélica entre ellos (Fernández *et al.*, 2013).



## CONCLUSIONES

1. Existe un elevado grado de diversidad en la raza Rubia Gallega, similar a otras razas de carne españolas.
2. La población estudiada se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, con un porcentaje de marcadores en dicho equilibrio ( $P > 0,01$ ) del 98,5%.
3. El grado de diferenciación genética poblacional medido estimado mediante el índice de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) varió de 0,0015 a 0,0025, siendo estos valores muy bajos y no significativos, sugiriendo la presencia de una única unidad poblacional en todos los ejemplares analizados de Rubia Gallega.
4. El parentesco molecular obtenido es prácticamente insignificante, al igual que el índice de consanguinidad que también es muy bajo y no significativo.
5. Es necesario el análisis de un elevado número de marcadores para obtener estimas de parentesco con un porcentaje de fiabilidad superior al 99%.

## AGRADECIMIENTOS

Los datos fueron cedidos por ACRUGA (Asociación nacional de criadores de ganado vacuno selecto de raza Rubia Gallega).

## BIBLIOGRAFÍA

- ACRUGA (2011) 'Programa de mejora de la raza bovina rubia gallega'.
- ACRUGA (2019) *Acruga*. Disponible en: <https://acruga.com/caracteristicas.asp> (Consultado: 10 Julio 2019).
- Becerra, J. J. (2002) *Influencia de factores endógenos y exógenos sobre los parámetros reproductivos en hembras bovinas de raza Rubia Gallega*. Universidad de Santiago de Compostela. doi: 10.13140/RG.2.1.2103.8481.
- Boyles, S. L. y Pellegrino, J. M. (2009) 'World Beef Cattle Production', *Agricultural Sciences*, 1.
- Brea, T., J. García, L. Monserrat, L. S. y J. A. C. (1998) 'Modelización, crecimiento y rendimiento potencial de machos y hembras de raza Rubia Gallega. Memoria CIAM', *Xunta de Galicia. Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria*, 94–96, pp. 313–324.
- Cañas-Álvarez., et al (2015) 'Genetic diversity and divergence among Spanish beef cattle breeds assessed by a bovine high-density SNP chip 1', *Animal Society of Animal Science*, pp. 5164–5174. doi: 10.2527/jas2015-9271.
- Christopher Chang (2019) *PLINK 1.9*. Disponible en t: <http://www.cog-genomics.org/plink2/> (Consultado: 10 Abril 2019).
- Decker, J. E. *et al.* (2014) 'Worldwide Patterns of Ancestry , Divergence and admixture in domesticated cattle', *PLOS Genetics*, 10(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1004254.
- Deepti Joshi,N. Beth Harris, Ray Waters, Tyler Thacker, Barun Mathema, Barry Krieswirth, y Srinand Sreevatsana (2012) 'Single Nucleotide Polymorphisms in the Mycobacterium bovis Genome', *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), pp. 3853–3861. doi: 10.1128/JCM.01499-12.
- van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. (2014) 'Ten years of next-generation sequencing technology', *Trends in Genetics*, 30, pp. 418–426.

- Edea, Z. *et al.* (2013) 'Genetic diversity , population structure and relationships in indigenous cattle populations of Ethiopia and Korean Hanwoo breeds using SNP markers', *Frontiers in genetics*, 4, pp. 1–9. doi: 10.3389/fgene.2013.00035.
- Essa, I. B. *et al.* (2001) 'Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes', *Genetics Selection Evolution*, 33, pp. 311–332.
- Fernández, M. E. *et al.* (2013) 'Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification , traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd', *Genetics and Molecular Biology*, 36, pp. 185–191.
- Fisher, P. J. *et al.* (2009) 'The number of single nucleotide polymorphisms and on-farm data required for whole-herd parentage testing in dairy cattle herds', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 92(1), pp. 369–374. doi: 10.3168/jds.2008-1086.
- Flanagan, S. P. y Jones, A. G. (2019) 'The future of parentage analysis : From microsatellites to SNPs and beyond', *Molecular Ecology*, pp. 544–567. doi: 10.1111/mec.14988.
- Gautier, M. *et al.* (2007) 'Genetic and haplotypic structure in 14 European and African Cattle Breeds', *Genetics Society of America*, pp. 1059–1070. doi: 10.1534/genetics.107.075804.
- Genoma España (2011) 'Selección Genética y Genómica en Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Acuicultura. Informe de Vigilancia Tecnológica'.
- Hardy OJ, V. X. (2002) 'SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels', *Molecular Ecology*, 2, pp. 618–620. doi: 10.1046/j.1471-8278.
- Heaton, M., Harhay, G., Bennett, G. *et al* (2002) 'Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle', *Mammalian Genome*, 13(5), pp. 272–281.
- Heaton MP, Keen JE, Clawson ML, Harhay GP, Bauer N, Shultz C, Green BT, Durso L, Chitko-McKown CG, L. W. (2005) 'Use of bovine single nucleotide polymorphism markers to verify sample tracking in beef processing', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, pp. 1311–1314. Disponible en: <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1311>. (Consultado: 15 Junio 2019)

- Illumina, I. (2015) 'BovineHD Genotyping BeadChip', *Agrigenomics*, 05.
- José Atilio Aranguren-Méndez ; Xomaira Rincón-Carruyo y Rafael Roman Bravo  
(2017) 'Aplicación de la genética molecular en la producción animal', *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 1(1), pp. 1–13.
- Koolmees, P. A. y Lenstra, J. A. (2014) 'On the History of Cattle Genetic Resources', *Diversity*, pp. 705–750. doi: 10.3390/d6040705.
- Lischer, H. E. L. y Excoffier, L. (2012) 'PGDSpider : an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs', 28(2), pp. 298–299. doi: 10.1093/bioinformatics/btr642.
- Liu, Y. *et al.* (2009) 'Bos taurus genome assembly', *BMC Genomics*, 11, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2164-10-180.
- López de Heredia, U. (2016) 'Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica', *Munibe, Ciencias naturales.*, 64, pp. 7–31. doi: 10.21630/mcn.2016.64.07.
- M.C. McClure<sup>1</sup>, J. McCarthy<sup>1</sup>, P. Flynn<sup>2</sup>, R. Weld<sup>2</sup>, M. Keane<sup>1</sup>, K. O'Connell<sup>1</sup>, M. Mullen<sup>3</sup>, S. Waters<sup>3</sup>, J. F. K. (2015) 'SNP selection for nationwide parentage verification and identification in beef and dairy cattle', *Proceedings, International committee for animal recording technical series*, pp. 175–181.
- Markovtsova, L., Marjoram, P. y Tavaré, S. (2000) 'The Age of a Unique Event Polymorphism', *Genetics Society of America*, 156, pp. 401–409
- Matukumalli, L. K. *et al.* (2009) 'Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for Cattle', *PLOS one* 4(4). doi: 10.1371/journal.pone.0005350.
- Mcclure, M. C. *et al.* (2018) 'SNP Data Quality Control in a National Beef and Dairy Cattle System and Highly Accurate SNP Based Parentage Verification and Identification', *Frontiers in genetics*, 9, pp. 1–14. doi: 10.3389/fgene.2018.00084.

- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2019) *Razas ganaderas: Raza bovina RUBIA GALLEGA*, n.d. Disponible en:  
<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/bovino/rubia-gallega/default.aspx>  
(Consultado: 15 Julio 2019).
- Nei, M. (1978) 'Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals', *Genetics*, 89, pp. 583–590.
- Oliete, B., Moreno, T., Carballo, J. A., Monserrat, L., Sánchez, L. (2006) 'Estudio de la calidad de la carne de ternera de raza rubia gallega a lo largo de la maduración al vacío', *Archivos de Zootecnia*, [en línea], 55(209), p. pp.3-14. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49520901>.
- Ortega, J. (2011) 'El genoma bovino, métodos y resultados de su análisis', *Revista MVZ Córdoba, Revisión de Literatura*, 16(1), pp. 2410–2424.
- Ramos, A. M. *et al.* (2009) 'Design of a High Density SNP Genotyping Assay in the Pig Using SNPs Identified and Characterized by Next Generation Sequencing Technology', *PLOS one* 4(8). doi: 10.1371/journal.pone.0006524.
- Rof Codina, J. (1916) 'La raza bovina gallega', *Memoria Asociación Nacional de Ganaderos. Madrid*.
- Rousset, F. (2008) 'Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux', *Molecular Ecology*, Resources, pp. 103–106.
- S. Dunner, N. Sebane, D. García, O. Cortés, A. Valentini, J. L. W. y B. Mangin, J. Cañón, H. Levéziel, T. G. C. (2013) 'Association of genes involved in carcass and meat quality traits in 15 European bovine breeds', *Livestock Science*, 154, pp. 34–44. doi: 10.1016/j.livsci.2013.02.020.
- Sánchez Belda, A. (2002) 'Razas ganaderas españolas bovinas', *Feagas Mapa*, 1ª Ed.
- Schloss, J. . (2008) 'How to get genomes at one ten-thousandth the cost', *Nature Biotechnology*, 26, pp. 1113–1115.

- Strucken, E. M., Gudex, B. , Ferdosi, M. H., Lee, H. K., Song, K. D., Gibson, J. P., Kelly, M. , Piper, E. K., Porto Neto, L. R., Lee, S. H. y Gondro, C. (2014) 'Performance of different SNP panels for parentage testing in two East Asian cattle breeds', *Animal Genetics*, 45, pp. 572–575. Disponible en: 10.1111/age.12154.
- The Bovine HapMap Consortium (2009) 'Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds', *Science*, 324(5926), pp. 528–532. doi: 10.1126/science.1167936.Genome-Wide.
- Vandeputte, M. y Haffray, P. (2014) 'Parentage assignment with genomic markers : a major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals', *Frontiers in genetics*, 5, pp. 1–8. doi: 10.3389/fgene.2014.00432.
- Vignal, A., Milan, D., S. y M., y Eggen, A. (2002) 'Areview on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics', *Genetics Selection Evolution*, 34, pp. 275–305.
- Wang, D. G. *et al.* (1998) 'Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome', *Science*, 280(5366), pp. 1077 – 1082. doi: 10.1126/science.280.5366.1077.
- Wang, J. (2002) 'An Estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers', *Genetics Society of America*, 1215, pp. 1203–1215.
- Wiedmann, R. T., Smith, T. P. L.y Nonneman, D. J. (2008) 'SNP discovery in swine by reduced representation and high throughput pyrosequencing', *BioMed Central*, 7, pp. 1–7. doi: 10.1186/1471-2156-9-81.
- Zhao, K.; Prenger, K.; Smith, L. (2013) 'Stormbow: A cloud-based tool for reads mapping and expression quantification in large-scale RNA-seq studies', *ISRN Bioinformatics*, pp. 481–545.
- Zhao, F. *et al.* (2015) 'Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information', *Genetics Selection Evolution.*, pp. 1–12. doi: 10.1186/s12711-015-0127-3.